

一細胞レベルでのエクソソーム解析に向けたマイクロ流体デバイスの開発

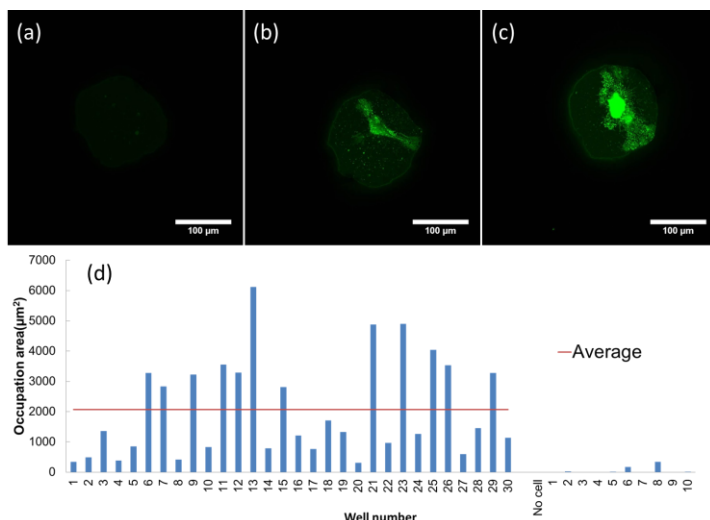
Development of a microfluidic chip for exosome study in Single-cell level

○筒井 敬悟¹、ESPULGAR Wilfred Villariza¹、斎藤 真人¹、民谷 栄一¹ (1. 阪大工)

○Keigo Tsutsui¹, ESPULGAR Wilfred Villariza¹, Masato Saito¹, Eiichi Tamiya¹ (1.Osaka Univ.)

E-mail: tsutsui@ap.eng.osaka-u.ac.jp

エクソソームとは細胞が放出する直径 30~100nm の膜小胞である。主にエクソソームは細胞間の情報伝達に用いられており、エクソソーム内には mRNA や miRNA、MHC 抗原などが含まれているために遺伝子発現や免疫応答の制御に関わっていることが示唆されている。近年アルツハイマー病と密接に関連していることが明らかになるなど、医療分野においてエクソソームは注目を集めているが、一細胞レベルでのエクソソーム研究が注目されている。そこで一細胞レベルでのエクソソーム解析に向けた、エクソソームの捕捉、選択的な回収が行えるマイクロ流体デバイスの開発に取り組んでいる。本研究では、エクソソームを捕捉するために T 細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子 4 (Tim4) を用いている。Tim4 はホスファチジルセリン (PS) と結合すること、その結合が Ca 依存性であることが知られており、エクソソームの膜表面には PS が散在しているためにエクソソームの捕捉、回収が可能となることが期待される。また本研究では直径 100 μ m、深さ 50 μ m のウェルを間隔 100 μ m で 12 $\times$ 12 に並べた PDMS アレイシートを作製しており、この PDMS シートをスライドガラスと貼り合せ表面を Tim4 でコーティングしたものをマイクロアレイチップとした。まずマイクロアレイチップの評価のため、チップ上に培養細胞 NIH3T3 をまき 6 時間静置した後に、顕微鏡を用いてウェル内の細胞数分布を測定した。その結果、約 30% のウェル内において一細胞の捕捉が確認できた。つまり 1 つの PDMS アレイシートにつき約 40 個の一細胞が捕捉可能となる。次にマイクロアレイチップ上に NIH3T3 をまき 24 時間静置した後、Exo-Green 試薬を用いてエクソソームを蛍光染色した。結果として下図のように細胞によってエクソソームの放出量に差があることが明らかとなった。これから、一細胞レベルでのエクソソーム解析が重要であるといえる。



(a) ウェル内に細胞が含まれない場合の蛍光画像 (b) (c) ウェル内に一細胞が含まれる場合の蛍光画像 (d) 一細胞のみを捕捉した 30 個のウェル内におけるそれぞれの蛍光占有面積と細胞が含まれない 10 個のウェル内の蛍光占有面積